

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

EP99/04470.



E. J. U

Bescheinigung

Herr Professor Dr. Günter F u h r in Berlin/Deutschland hat eine Patentanmeldung
unter der Bezeichnung

"Mikrosystem biologischer Partikel"

am 29. Juni 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole B 04 B und C 12 M der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 25. August 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 198 28 919.7

Keller

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Mikrosystem biologischer Partikel

Beschreibung der Erfindung

Gewöhnlich werden fluidische Mikrosysteme mit einer Flüssigkeit durchströmt. Die auf beiden Kanalenden (oben, unten) aufgebrachten Mikroelektroden führen zu einer Kompartimentierung des Kanals mittels hochfrequenter elektrischer Felder, so daß diese die suspendierten Teilchen in der gewünschten Weise ablenken. Schwierigkeiten bereiten vor allem die Einspülungen der Zellen und die notwendigen geringen Strömungsgeschwindigkeiten (einige $\mu\text{l/h}$), die mit steigender Miniaturisierung immer gravierende Einschränkungen mit sich bringen.

Erfindungsgemäß werden derartige Mikrosysteme mit dem Prinzip des Zentrifugierens kombiniert. Die suspendierten Partikel bewegen sich daher aufgrund der Zentrifugalkräfte durch die Mikrokanäle, in denen sie (ohne austreten zu können) aufgetrennt, in eine vorher festgelegte Position, fusioniert, sortiert, permeiert werden.

In Fig. 1 ist der makroskopische Aufbau dargestellt. An einem üblichen oder modifizierten Rotor 11 einer Zentrifuge befinden sich die Aufnahmen 12, in die paßgerecht und für die applizierten Drehzahlen entsprechend eine Elektronik 13 zur Ansteuerung der Mikrosysteme mit hochfrequenten Wechsignalen verschiedener Phasenlage und Amplitude eingesetzt ist. Die Elektronik ist über Kabel 14, Stecker oder anderweitig mit einem Mikrosystem 15 verbunden. Das Mikrosystem hat ein Eingangspot 18, das verschieden groß ausgelegt werden kann und vor der Zentrifugation mit der Teilchen- oder Zellsuspension gefüllt wird. Über die Zentrifugationskräfte durchlaufen die Teilchen das elektronisch gesteuerte Mikrokanalsystem und sammeln sich

M 18. 10. 99

in bestimmten Zonen (z.B. an den geschlossenen Enden 17 des von der Rotorachse wegweisenden Teils des Mikrosystems).

Bei diesem Durchlauf werden sie nach vergebbaren Programmen behandelt. Da die Teilchen in Abhängigkeit von ihrer Dichte verschiedene Bewegungen und Endpositionen einnehmen, wird in der vorliegenden Erfindung der Vorteil der Zentrifugaltrennung und -bewegung mit den Möglichkeiten der programmierbaren Dielektrophorese kombiniert. In der Regel wird negative Dielektrophorese, in Ausnahmefällen auch positive Dielektrophorese der Teilchen genutzt. Ein weiterer Vorteil der erfinderischen Lösung ist die Steuerung der Teilchenbewegung über die Rotationsgeschwindigkeit (ω) des Rotors 11. Da hierbei ebenfalls programmierbare Variationen durchlaufen werden können, wird ein zweiter Komplex von festlegbaren Parametern hinzugenommen.

Fig. 2 zeigt in schematischer Weise ein Mikrosystem zur Auftrennung eines Partikelgemisches, bestehend aus größeren Teilchen (z.B. Zellen) 21 und kleinen Teilchen 22, die in einer Suspension vorliegen. Die Zentrifugationskräfte wirken in Pfeilrichtung 23. Die typischen Abmessungen des Kanalsystems 24 sind die folgenden:

Breite:	einige 10 μm bis zu einigen mm (typischerweise: 200 - 400 μm)
Länge:	einige mm bis zu einigen cm (typischerweise: 20 - 50 mm)
Höhe:	einige μm bis zu einigen 100 μm (typischerweise: 50 μm)

Entscheidendes Merkmal der Mikrossysteme ist, daß auf der Oberseite 25 und Unterseite 26 des Kanals 24 Mikroelektroden 27a, 27b übereinander angeordnet sind, die bei Ansteuerung mit einer Wechselspannung (in der Regel einer Frequenz im MHz-Bereich und einer Amplitude von einigen Volt) quer zum Kanal

Feldbarrieren erzeugen, die über negative (bedingt auch positive) Dielektrophorese die Teilchen ablenken (im hier gezeigten Fall die großen Teilchen).

Das Verfahren ist nun wie folgt durchzuführen:

Vor der Zentrifugation wird das System mit einer Flüssigkeit gefüllt. Kurz vor Beginn der Zentrifugation werden die Elektroden 27a, 27b angesteuert und im Eingangstrichter als Reservoir 28 wird die Teilchensuspension zugegeben. Sedimentierende Teilchen werden dadurch bereits über das elektrische Feld nach rechts verschoben. Die Darstellung in Fig. 2 zeigt die Verhältnisse während der Zentrifugation. Durch die exakt einstellbaren Zentrifugalkräfte über die Rotationsgeschwindigkeit bewegen sich die Teilchen in den unteren Teil des Mikrosystems. Entsprechend der üblichen Zentrifugationsprinzipien sedimentieren die Teilchen mit der größten Dichte zuerst. Nehmen wir an, die Teilchen 21 würden durch die elektrische Feldbarriere im Kanal nach rechts verschoben, während die Teilchen 22 davon unbeeinflusst bleiben, so ergibt sich in den Kanalenden 29a, 29b eine Trennung beider Sorten. Die Teilchen in jedem der Kanalenden ordnen sich zusätzlich wie bei der üblichen Zentrifugation entsprechend ihrer Dichte an. Das dargestellte Mikrosystem kann als das einfachste mögliche System angesehen werden. Der Vorteil besteht darin, daß keine Lösungsströmung entsteht und dennoch die Partikelbewegung gerichtet und einstellbar ist. Derartige Systeme können auch entgegengesetzte Bewegungen erzeugen, wenn die Teilchen einen Auftrieb besitzen.

Ein weiteres System (programmierbares Beladungsmikrosystem für Zellen und Teilchen) ist in Fig. 3 gezeigt. Hier ist der Zentrifugationskanal in drei Teile 31a, 31b, 31c unterteilt. In den Zwischenwänden befinden sich Öffnungen 32, durch die wieder Elektroden 33 auf der Ober- und Unterseite des Kanals hindurchreichen. Die Öffnungen sind der Teilchengröße angepaßt

(typischerweise 5 bis 20 mal der Durchmesser). Zu Beginn werden in jeden der Kanalteile 31a bis 31c verschiedene Lösungen eingefüllt. Danach werden in einen Kanalteil (hier z.B. 31c) die Teilchen eingefügt. Durch die Zentrifugation gelangen die Teilchen (z.B. zuerst die schwarzen, dann die hellen) an die Elektroden 33 und können so automatisch über die elektrischen Feldbarrieren durch die Öffnungen 32 in die Nachbarlösungen überführt werden.

Auch hier kommt es zu einer Sortierung in den drei Kanalenden 31d, 31e, 31f und gleichzeitig zu einer Anordnung der Teilchen entsprechend der Dichteunterschiede.

Weitere allgemeine Eigenschaften der Mikrosysteme:

- Sie können Öffnungen (Zuflüsse, Durchflüsse, Abflüsse) besitzen, die sich verschließen lassen, so daß die Teilchen nach der Zentrifugation oder davor leicht entnommen oder eingefügt werden können.
- Es können all die Mikroelektrodenelemente (Halteelektroden für Teilchen, Mikrofeldkäfige etc.) eingebaut werden, die für die dielektrophoretische Beeinflussung von Teilchen ansonsten eingesetzt werden.
- Das Verfahren ist als elektrisch gesteuerte (oder aktive) Zentrifugation zu bezeichnen.
- Prinzipiell lassen sich in derartigen Mikrosystemen auch optische Kräfte (Laser-tweezers), Ultraschallkräfte, magnetische Kräfte in analoger Weise anwenden.

M 18.10.99

Anwendungsgebiete sind:

- Zelltrennung/-fraktionierung
 - Zellsortierung
 - Zellbeladung (molekular, Nanoteilchen, Beads)
 - Zellentladung (molekular)
 - Zellpermeation (sog. Elektroporation)
 - Zellfusion (sog. Elektrofusion)
 - Zellpärchenbildung
 - Zellaggregatbildung.
-
- Die Mikrosysteme sind in der Anlage der Kanäle und Mikroelektroden des jeweiligen Aufgabe angepaßt.
 - In ähnlicher Weise, nur mit niedrigeren Kanälen, lassen sich Systeme für Bakterien und Viren, bzw Zellorganellen aufbauen. Typische Höhe dieser Kanäle $<10 \mu\text{m}$.
 - Entsprechende Mikrosysteme können auch während der Zentrifugation oder schrittweise gedreht werden.

M 18.10.98

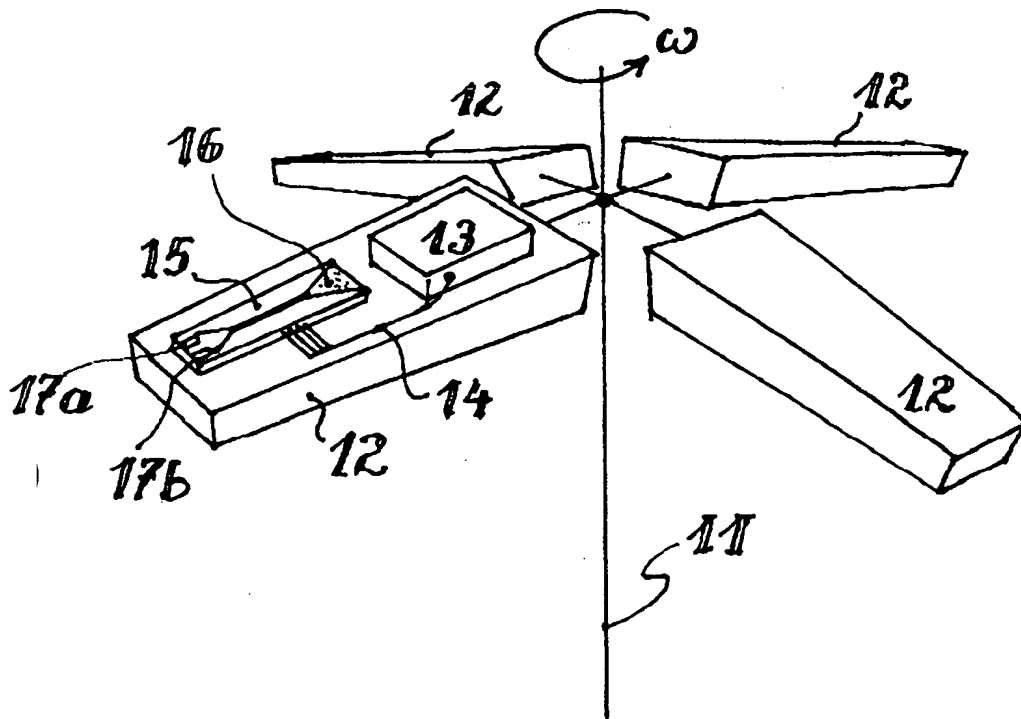


Fig. 1

M 18.10.99-1.9-

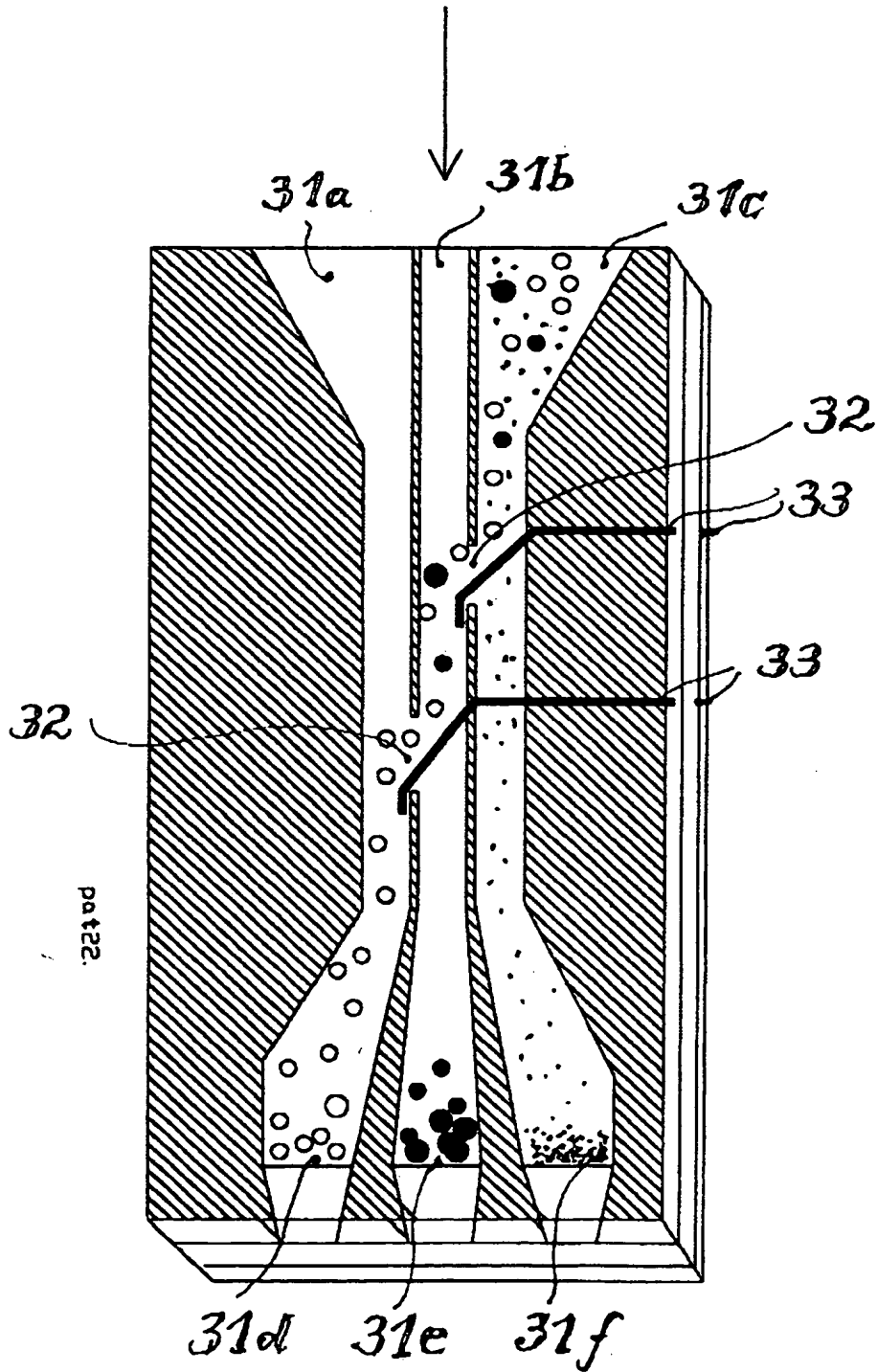


Fig. 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)